

# 透析膜内 DNA 水溶液によるダイオキシン類の濃縮 - 微量汚染物質の除去と分析技術への応用 -

COE-RA: 佐藤 秀哉 (資源化科学講座 博士後期課程二年)

指導教官: 西 則雄 教授

## (緒言)

人類社会の拡大そして科学技術の進歩に伴って人為的に産生された化学物質は膨大な量と種類に達し、時に公害のような大規模な災禍を引き起こす要因となった。近年には内分泌攪乱化学物質による生殖異常誘発現象に代表される、環境中の微量物質を原因とする生態系への負の影響が提唱されるなど、これまで認知されていなかったリスクに対しても懸念が広まっている。多くの場合それらの汚染実態の調査は非常に困難であるとされ、その最大の理由として、対象物質が環境中に非常に稀薄な濃度で存在するのみならず、種々の夾雑成分や包摂成分と共に分布していることが挙げられる。そのため高感度分析を行う際には多段階抽出や濃縮を重ねる煩雑な前処理が不可避となる。また対象系が巨大であるために分解処理も容易ではない。

筆者の所属する研究室では以前より環境修復 / 浄化技術の確立を課題として、内分泌攪乱化学物質などの難分解性化学物質を対象とする物質分離デバイスの開発を目指して研究を行ってきた。特に近年は DNA (デオキシリボ核酸) と一群の内分泌攪乱化学物質、発がん性物質との間に見られる選択的物質吸着作用に注目し、種々の DNA 複合材料を開発してきた。

DNA は遺伝子の本体として生体遺伝機構の根幹を成す物質であり、分子生物学の礎たる物質である。また、「二重らせん構造」や「核酸塩基対の積層構造」などの特徴的な構造と種々の特異な物性から、近年、ナノテクノロジー分野のキーマテリアルとしても注目されている物質である。DNA の積層した核酸塩基対が形成する疎水ドメインに環式化合物が捕捉されて安定化する「インターカレーション」という現象は特に興味深く、他の合成高分子では模倣しがたい DNA のナノオーダーの規則構造に基づく機能として認知されている。本研究は DNA のこのような機能を有害物質に対して適用し、大規模な系に含まれる微量汚染物質の分離技術へと展開することを目標としたものである。

筆者らは物質分離材料を設計する上での指針として、十分量のリガンド (DNA) が安定に担持され、吸着キャパシティが確保されることを第一義と定めた。故に、従来型の合成化学的手法のように安定性 / 設計性に優れるものの絶対的な担持量に制約を受ける方法論は必ずしも最良ではない。しかしながら材料の安定性の確保、即ち十分な機械的強度の付与と水溶性 / 生分解性の抑制は非常に重要な課題であり、これらを満足する方法論の確立が求められていた。平成16年度、筆者はゾル-ゲル法を介した無機マトリックスへの DNA 固定技術を確立し、作製した DNA 複合材料について種々の特性評価を行った。

## 〔研究概要〕

本研究では有機無機複合材料の有力な合成手段である「ゾル ゲル法」を用いて DNA とシリカとを構成要素とする複合材料を作製した。ゾル-ゲル法は、反応性末端を有する金属化合物の均一溶液から加水分解反応と縮合反応とを経て、無機酸化物のマトリックスを常温生成する技術である。原理的にはマトリックスの形成過程に任意の物質を共存させることでその包括固定が可能となる。有機成分と無機成分の複合化を行う利点としては一般に機械的強度や熱安定性の向上などが挙げられる。また、外部の溶媒や温度、圧力等の要因に影響されにくい無機高分子を構成要素とすることで、酵素などの生体物質を外的な要因に対して安定化した例がある。無機高分子をマトリックスに採用することで、高い送液圧と多様な溶媒環境への耐久性が求められる HPLC 用充填材などへ DNA 複合材料の用途を展開できる可能性がある。

### DNA-シリカコンポジットの調製

出発原料としてテトラエトキシシラン (TEOS)、アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) および高分子量 DNA (鮭精巢由来、 $M_w: 5 \times 10^6$ ) の三成分を採用した。酸触媒存在下 TEOS を部分加水分解して得た前駆体溶液 (= シリカゾル) および DNA 水溶液、APTES / エタノール溶液を適当な条件で混合しゲル化を誘導、サンプルに一定時間の熟成処理と脱塩処理を施した後、凍結乾燥を行った。

### DNA-シリカコンポジットの物性評価

材料組成と「DNA 保持作用」、「物質吸着特性」に関して、主として分光学的方法を用いて評価を行った。

## 〔結果 / 考察〕

コンポジットの安定性についてその DNA 保持能力から評価を行った。コンポジット内に分散して存在する高分子量 DNA は緻密なゲルマトリックスによって物理的に拘束され、外部への脱離が抑制されていた。さらにマトリックスの成分としてカチオン性シランカップリング剤である APTES を一定量添加した場合には DNA 溶出をほぼ完全に抑制できることがわかった。これは静電的吸着作用による効果と考えられる。DNA 保持能力とマトリックス中の APTES 含量には Figure 2 に示すように明確な相関が見られた。

次いで DNA に由来する物質吸着特性の評価を行うため、臭化エチジウムやジベンゾフラン (ダイオキシン誘導体) などインターカレータを対象とした単純吸着試験および非インターカレータを含む二成分系からの競合吸着試験を行った。

その結果の一部を Figure 3 に示す。条件を最適化した系ではインターカレータに対する高い吸着作用と物質選択性が得られ、この際、興味深いことに物質選択性の発現が APTES の有無に

依存していることが見出された。すなわち DNA を含みかつ APTES を導入した試料において DNA 結合性物質への優先的な吸着作用が発現せられたのである。このようにコンポジットの性質に APTES が大きく関わる原因としてマトリックスの親水-疎水バランスへの影響や空孔率の増加、内部 DNA 鎖の自由度の維持への寄与などが推測されるものの、結論のためにはさらなる追加試験を要するだろう。

DNAに由来する物質吸着特性の継承の可否と材料組成には関連がみられ、最適化された複合材料ではDNA結合性物質に対する高い吸着作用が得られた。また多成分系における競合吸着処理では、各成分のDNAへの親和性の差に基づく分離結果が得られた。この吸着物質は適当な極性の有機溶媒を用いた抽出操作によって脱着可能であり、DNA-シリカ複合材料の再使用性も確認された。この材料は無機マトリックス中にDNAを均一的に分散して保持することで、アルコール濃度やイオン強度の極端に高い溶液など、通常はDNA分子の凝集や沈殿が発生するような溶媒環境下においても安定に性状を保った。このような性質はカラム充填材としての応用を強く支持するものである。

本研究はDNAとの相互作用を有する微量汚染物質の高精度分析および回収技術に関わる有用な材料を提案するものである。特定有害物質を選択的に分離回収するアフィニティー技術の発展は環境浄化への道程であり、本研究で開発したDNA複合材料そしてそれを基に構築した物質分離デバイスは、その発展に大いに貢献すると考える。またDNAは天然において無尽蔵に産生される未開発のバイオマスであり、これを高価値資源に転化することの意義は非常に大きい。この点についても本研究は大いに貢献する。

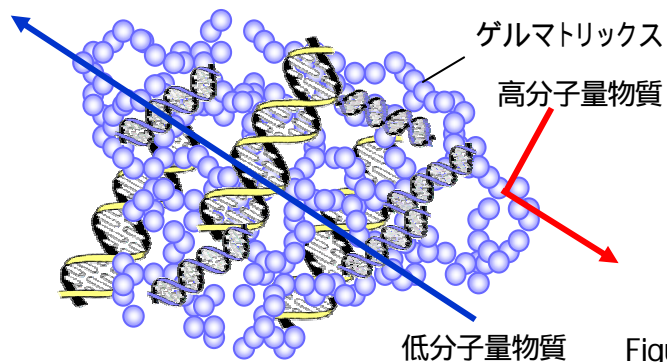


Figure 1. ゲルマトリックスによるDNAの隔離

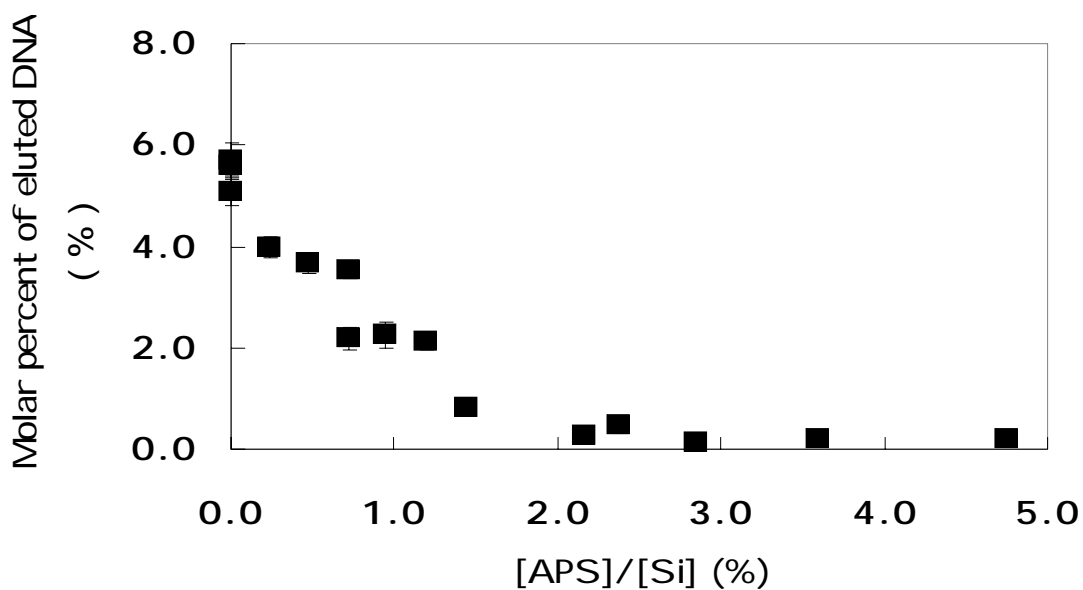


Figure 2. 試料組成とDNA保持作用の相関

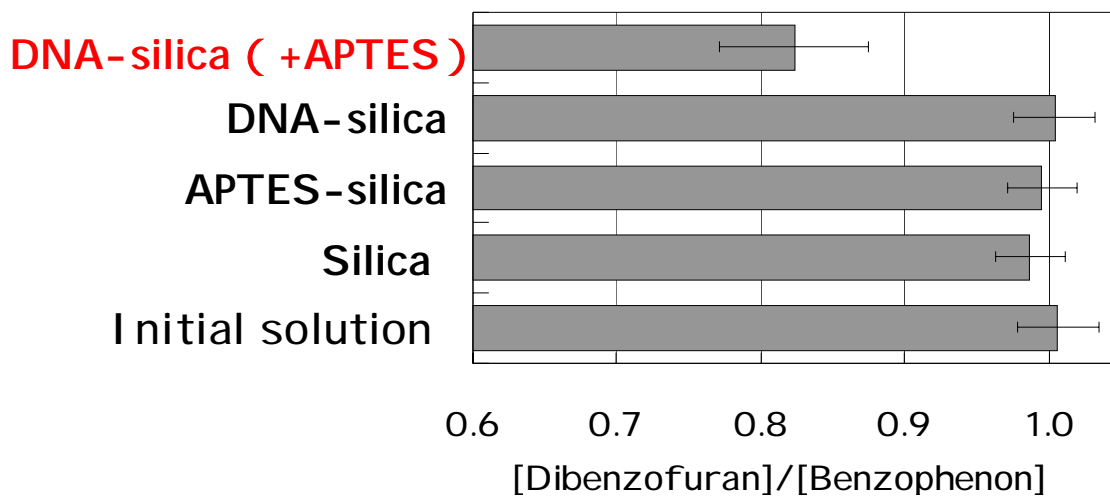


Figure 3. 選択的吸着作用の検証

## 研究論文

1. **Shuya Satoh**, Bunshi Fugetsu, Motoyoshi Nomizu and Norio Nishi

"Functional DNA-Silica Composite prepared by Sol-Gel Method"

*Polymer Journal*, vol. 37, No.2, pp.94-101, 2005

2. Bunshi Fugetsu, **Shuya Satoh**, Alexander Iles, Kazuhiko Tanaka, Norio Nishi

"Encapsulation of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in Ba<sup>2+</sup>-alginate to form coated micro-beads and their application to the pre-concentration/ elimination of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl from contaminated water"

*Analyst*, vol. 129, pp.565-566, 2004

3. Bunshi Fugetsu, **Shuya Satoh**, Toshikazu Shiba, Taeko Mizutani, Yong-Bo Lin, Norifumi Terui, Yoshinobu Nodasaka, Katsushi Sasa, Kiyoko Shimizu, Tsukasa Akasaka, Masanobu Shindoh, Ken-ichiro Shibata, Atsuro Yokoyama, Masanobu Mori, Kazuhiko Tanaka, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, Shunitz Tanaka, Norio Nishi and Fumio Watari

"Caged Multi-Walled Carbon Nanotubes as the Adsorbents for Affinity-Based Elimination of Ionic Dyes"

*Environmental Science & Technology*, vol 38, No. 24, pp.6890-6896, 2004

4. Bunshi Fugetsu, **Shuya Satoh**, Toshikazu Shiba, Taeko Mizutani, Yoshinobu Nodasaka, Keiji Yamazaki, Kiyoko Shimizu, Masanobu Shindoh, Ken-ichiro Shibata, Norio Nishi, Yoshinori Sato, Kazuyuki Tohji, Fumio Watari

"Large-Scale Production of Ba<sup>2+</sup>-Alginate-Coated Vesicles of Carbon Nanofibers for DNA-Interactive Pollutant Elimination"

*Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol.77, No.10, pp.1945-1950, 2004

5. **Shuya Satoh**, Motoyoshi Nomizu, and Norio Nishi

"DNA-Silica Composite Prepared by Sol-Gel Method as a Functional Material"

*Proceeding of 40th International Symposium on Macromolecules*, 2004

## 学会発表

**Shuya Satoh**, Motoyoshi Nomizu and Norio Nishi

"Preparation of DNA-Silica Composite by Sol-Gel Method and Its Application"

40<sup>th</sup> IUPAC World Polymer Congress MACRO 2004, Paris, France (July 7, 2004)